

MỘT SỐ NGUYÊN NHÂN KỸ THUẬT DẪN ĐẾN KẾT QUẢ ÂM TÍNH GIẢ VÀ DƯƠNG TÍNH GIẢ CỦA XÉT NGHIỆM PCR CHẨN ĐOÁN SARS-COV-2

Lê Nguyễn Minh Hoa¹, Phạm Việt Hùng²,
Trần Anh Đào³, Lê Xuân Tùng².

Xét nghiệm, truy vết và điều trị là ba trụ cột trong chiến lược phòng chống đại dịch COVID-19 của nước ta. Kết quả xét nghiệm chính xác do đó đóng vai trò vô cùng quan trọng để từ đó khoanh vùng dập dịch hiệu quả. Phương pháp xét nghiệm bằng kỹ thuật PCR được coi là tiêu chuẩn vàng để khẳng định ca bệnh nhờ độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Tuy nhiên, các phòng xét nghiệm cần lưu ý các yếu tố kỹ thuật có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm. Các nguyên nhân gây âm tính giả có thể do chất lượng mẫu không đạt, thời gian lấy mẫu, hay hóa chất sử dụng. Các nguyên nhân gây dương tính giả thường liên quan đến thao tác của kỹ thuật viên cũng như hóa chất, trang thiết bị. Nhận định tốt các nguyên nhân này sẽ giúp phòng xét nghiệm làm tốt hơn trong phiên giải kết quả, đồng thời đảm bảo chất lượng xét nghiệm để phục vụ chống dịch hiệu quả hơn.

Từ khóa: Kỹ thuật xét nghiệm, Âm tính giả, dương tính giả. SARS-CoV-2.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm trùng vi rút corona chủng mới là một bệnh đường hô hấp cấp tính gây nên bởi virus SARS-CoV-2. Triệu chứng nghiêm trọng có thể dẫn tới tỷ lệ tử vong lên tới 14,8% ở những người từ 80 tuổi trở lên⁽¹⁾. Mặc dù đại dịch được tuyên bố bởi Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) vào ngày 11/3/2020⁽²⁾ và các biện pháp ngăn chặn đã được ban bố trên nhiều quốc gia, tuy nhiên dịch bệnh vẫn tiếp tục lan truyền lên tới trên 166 triệu người nhiễm và gần 3.500.000 ca tử vong như đã được báo cáo vào ngày 23/5/2021⁽³⁾.

Xét nghiệm RT - PCR đã được sử dụng để phát hiện gen RNA của SARS-CoV-2 và được xem xét như là phương pháp chẩn đoán tiêu chuẩn. Xét nghiệm axit nucleic như RT - PCR có thể phát hiện các loại vi rút với độ nhạy và

độ đặc hiệu cao. Quy trình xét nghiệm PCR nhằm phát hiện SARS-CoV-2 do WHO khuyến cáo dựa trên sàng lọc gene E của vi rút và khẳng định bằng gene RdRp⁽⁴⁾. Tuy nhiên, phương pháp này yêu cầu thiết bị xét nghiệm chuyên dụng và đào tạo nhân viên với kỹ năng chuyên nghiệp. Ngoài ra, để có một kết quả xét nghiệm kịp thời và chính xác, các phòng xét nghiệm cần lưu ý đến một số yếu tố kỹ thuật có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm. Bài viết dưới đây sẽ phân tích cụ thể tác động của từng yếu tố có thể dẫn đến kết quả âm tính giả và dương tính giả của xét nghiệm PCR chẩn đoán SARS-CoV-2.

ÂM TÍNH GIẢ

Quá trình trước xét nghiệm

Chất lượng bệnh phẩm không đạt

Bệnh phẩm tiêu chuẩn để xét nghiệm PCR thành công là dịch tỵ hầu và dịch họng được lấy đúng phương pháp⁽⁵⁾. Các bệnh phẩm đường hô hấp trên khác như dịch rửa tỵ hầu có thể cho tải lượng vi rút thấp hơn hoặc thậm chí không phát hiện được virus. Cần nhấn mạnh là phải lấy đủ bệnh phẩm ở 2 vị trí trên bởi nếu chỉ xét nghiệm duy nhất dịch họng sẽ dẫn đến âm tính giả. Ngoài ra dịch tỵ hầu

⁽¹⁾Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương. ⁽²⁾Bệnh viện Nhi Trung ương.

⁽³⁾Bệnh viện Hữu nghị đa khoa Nghệ An.

Ngày nhận bài: 26/5/2021.

Ngày phản biện xong: 06/6/2021.

Ngày duyệt đăng: 10/6/2021.

Người chịu trách nhiệm nội dung khoa học: Lê Nguyễn Minh Hoa, Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương.

Điện thoại: 0983992810. E-mail: hoalenguyenminh@gmail.com

nếu không lấy được ở đúng vị trí giải phẫu mà chỉ ngoáy được phần ngoài khu vực tiền đình mũi cũng sẽ cho kết quả âm tính giả. Do đó việc đào tạo điều dưỡng viên, kĩ thuật viên lấy mẫu chuẩn xác là cực kỳ quan trọng.

Thời điểm lấy mẫu không phù hợp:

Thông thường lấy mẫu ngay khi xuất hiện triệu chứng bệnh, tuy nhiên với những trường hợp nhiễm không triệu chứng thì thời điểm lấy mẫu rất quan trọng. Lấy quá sớm (1 - 3 ngày) sau khi phơi nhiễm có thể dẫn tới âm tính giả do vi rút chưa kịp nhân lên đủ lượng để phát hiện được. Ngược lại lấy mẫu quá muộn (thường từ ngày bệnh từ 17 trở đi) cũng sẽ cho kết quả âm tính do lúc này cơ thể đã đào thải hết vi rút⁽⁶⁾. Lúc này thì cần làm thêm xét nghiệm kháng thể IgM - IgG để xác định liệu bệnh nhân đã phơi nhiễm hay chưa. Lưu ý rằng đối với COVID-19 thì IgM không phải là marker đặc hiệu cho giai đoạn cấp của bệnh⁽⁷⁾ như đối với các tác nhân thông thường khác bởi nhiều bệnh nhân IgM còn xuất hiện muộn hơn cả IgG.

Môi trường bảo quản, vận chuyển không đảm bảo:

Giai đoạn đầu của dịch, khi môi trường VTM còn chưa phổ biến thì nhiều đơn vị dùng nước muối sinh lý hoặc PBS (phosphat buffer saline) thay thế. Bản thân nước muối hay PBS không có chất ức chế PCR, tuy nhiên nếu ống đựng môi trường không đảm bảo, chẳng hạn dính 1 ít heparin hoặc có bột găng tay bám vào hay bất kỳ chất ức chế nào sẽ làm PCR không thực hiện được dẫn tới kết quả âm tính giả. Do đó, khuyến cáo nên mua sẵn ống môi trường vận chuyển tiêu chuẩn bởi môi trường này có tác dụng bảo quản vi rút sống để ngoài PCR còn có thể làm nuôi cấy, phân lập (nước muối hay PBS chỉ có thể dùng cho PCR do vi rút trong mẫu sẽ chết).

Quá trình trong xét nghiệm

Gộp mẫu quá nhiều: Hiện nay quy định cho phép có thể gộp đến 10 - 20 mẫu cho 1 phản ứng PCR⁽⁸⁾, tuy nhiên với những người làm PCR kinh nghiệm, gộp từ 5 mẫu trở xuống sẽ an toàn hơn. Lý do là vì khi gộp mẫu nghĩa là đã giảm thể tích tách chiết, do đó nguy cơ âm tính giả, bỏ lọt ca bệnh sẽ cao hơn. Thực tế cho thấy với những mẫu Ct tầm 33-35 trở lên thì khi gộp sẽ âm tính.

Đối với quy trình tách tay dùng kit (chẳng hạn Qiagen RNA extraction kit⁽⁹⁾).

Hóa chất tách chiết không đảm bảo: đặc biệt là carrier RNA do để lâu hoặc bảo quản không đúng cách. Theo

quy định của nhà sản xuất, carrier RNA sau khi hoàn nguyên, nếu dùng ngay thì cho vào lysis buffer AVL, nếu không dùng ngay phải chia vào các aliquot nhỏ và cất tủ -20o, lần sau lấy đủ lượng ra dùng, tránh tan đông nhiều lần. Nếu làm không đúng thì hiệu suất thu RNA sẽ bị ảnh hưởng dẫn đến âm tính giả. Do đó, để đảm bảo chất lượng thì mẫu nên tách cùng chứng nội tại là EAV là một virus RNA từ hải cẩu (equine). Nếu chứng nội tại cho kết quả tốt thì có thể tin tưởng hiệu suất tách chiết đảm bảo.

Nhầm buffer: điều này dễ xảy ra do kĩ thuật viên mới làm, chưa thạo quy trình nên dễ nhầm thứ tự cho các buffer gồm cõn, AW1. AW2 hoặc rửa lần 2 lẽ ra phải cho AW2 nhưng lại dùng nhầm lọ AW1. Ngoài ra sai sót còn có thể gặp khi quên không thêm cõn vào 2 lọ AW1 và AW2. Thông thường nếu tách ít thì không mấy khi quên nhưng khi tách chiết nhiều và dùng kit mới liên tục thì dễ gây nhầm lẫn giữa buffer của kit cũ và kit mới. Để tránh hiện tượng này thì nên cố gắng dùng hết vật tư của kit cũ mới chuyển sang kit mới và các buffer cũ còn thừa thì nên bỏ đi. Trong thực tế các phòng thí nghiệm hay dõn buffer thừa lại dẫn tới nhầm lẫn lọ cũ lọ mới. Ngoài ra cũng cần đánh dấu lọ nào đã thêm cõn và ngày mở lọ để người dùng sau dễ dàng phân biệt.

Đối với tách chiết hệ thống tự động: (chẳng hạn Magna Pure 96, Magna 24) các hệ thống này thường sử dụng bi từ thu RNA nên hiệu suất thu hồi RNA phụ thuộc máy móc và hóa chất hãng, tuy nhiên thường không tốt bằng tách tay. Do đó khuyến cáo nên tách cùng chứng nội tại và chạy PCR cùng để đảm bảo chất lượng xét nghiệm.

Tra mẫu bỏ sót hoặc thiếu thể tích mẫu: tách chiết xong thì sẽ thêm 5 - 10ul RNA khuôn mẫu vào ống master mix để chạy phản ứng PCR. Tuy nhiên nếu chạy nhiều (làm PCR đĩa) mà lại dùng pipette đơn kênh thì rất dễ bỏ sót hoặc hút thiếu thể tích gây âm tính giả. Giải pháp cho tình trạng này là dùng pipette đa kênh nếu mẫu được tách chiết tự động. Còn nếu mẫu tách tay thì tốt nhất khi tra mẫu nên có 2 người và hạn chế chạy mẫu đêm bởi khi KTV mệt, đếm nhầm thì rất dễ dẫn đến sai sót.

Quá trình sau xét nghiệm

Sau khi hoàn tất chương trình PCR, một số máy cho phép chỉnh baseline (đường nền) theo đó giá trị Ct value cũng sẽ thay đổi nhất định. Nếu chỉnh baseline quá cao sẽ khiến một số mẫu đang từ dương tính yếu thành âm tính.

Đối với trường hợp này cần xem cụ thể từng đồ thị của mẫu nghi ngờ và chạy lại nếu cần. Tuy nhiên khuyến cáo không nên chỉnh baseline quá cao, giá trị huỳnh quang cho baseline (trục tung của đồ thị) nên trong khoảng từ 300 - 500 là vừa. Nếu tín hiệu nền quá nhiều thì cần xem xét thay probe mới bởi probe để lâu hoặc tan đông nhiều lần hoặc không quần giấy bạc sẽ gây đứt gãy reporter làm tăng huỳnh quang nền dẫn đến nhiễu.

Ngoài ra còn một nguyên nhân nữa đó là gene đích khác nhau dẫn đến khó khăn trong nhận định kết quả. Phổ biến nhất là gene E dương tính trong khi RdRp lại âm tính. Lý do là vì RdRp kém nhạy hơn E do đó gene E được dùng trong sàng lọc còn RdRp chỉ dùng để khẳng định. Hiện nay thì quy trình của WHO đã cho phép chỉ cần gene E dương tính rõ là có thể kết luận ca bệnh được (10). Tuy nhiên cũng cần cảnh giác bởi vẫn có khả năng dương tính giả nên nếu vẫn nghi ngờ cần làm thêm phương pháp khác hoặc đơn giản hơn là chạy thêm các gene khác như N hoặc Orf1ab (Open reading frame) để có thể kết luận dễ dàng hơn.

DƯƠNG TÍNH GIẢ

Trước xét nghiệm: do ống vận chuyển môi trường bị nhiễm. Khả năng này tuy ít xảy ra nhưng vẫn có thể gặp do ống chứa môi trường vận chuyển khi bảo quản ở phòng xét nghiệm chưa đúng cách (chẳng hạn để chung trong tủ với bệnh phẩm) hoặc chuyển xuống khoa lâm sàng nhưng điều dưỡng viên bỏ quên dẫn đến để lâu khiến chất lượng ống không tốt. Để khắc phục thì cần dùng ống còn hạn sử dụng và không phát ống môi trường quá nhiều cho lâm sàng. Tốt nhất khi giao nhận môi trường cần kí sổ người giao nhận, ngày giờ và số lượng ống phát ra để sau này tiện tra cứu.

Trong xét nghiệm: nhiễm chéo từ mẫu dương cao tách cùng mẻ chạy: khi tách chiết 24 mẫu cùng nhau, nếu trong mẻ tách có những mẫu tải lượng vi rút cao mà thao tác pipette lại không tốt, tạo giọt bắn thì rất dễ nhiễm sang các mẫu lân cận. Có thể phát hiện được khả năng này khi luôn tách cùng mẫu Mock là mẫu chỉ có nước cất thay vì bệnh phẩm. Nếu mẫu mock hay còn gọi là chứng âm tách chiết dương tính thì nên làm lại cẩn thận hoặc thay KTV khác tách chiết. Nếu kết quả vẫn dương thì cần thay bộ hóa chất tách chiết mới bởi lúc này khả năng cao là hóa chất dung dịch tách chiết đã bị nhiễm. Ngoài hóa chất thì các thiết bị phụ trợ dùng trong tách chiết như máy

vortex, máy ly tâm và đặc biệt pipette cũng cần vệ sinh thường xuyên bằng cồn hay dung dịch khử DNA, RNA nhằm loại bỏ nguy cơ nhiễm. Môi trường phòng tách chiết cũng phải bật đèn cực tím thường xuyên vừa để đảm bảo an toàn sinh học vừa giảm thiểu nguy cơ nhiễm PCR.

Nhiễm chứng âm hóa chất (NTC - no template control): chứng âm hóa chất bị nhiễm thường do hóa chất mở ra mở vào nhiều lần hoặc sử dụng chung pipette với phòng tách chiết hay tra mẫu. Khi hiện tượng này xảy ra cần kiểm tra lại cẩn thận và bỏ bộ hóa chất bị nhiễm ngay. Tuyệt đối không di chuyển pipette từ phòng sạch (hóa chất) sang phòng tách chiết hay tra mẫu và ngược lại. Ngoài ra cần tuân thủ quy trình xét nghiệm là pha mix trước, sau đó mới làm tách chiết và tra mẫu PCR. Nếu có quá nhiều mẻ chạy thì nên phân công người chuyên pha mix, người chuyên tách chiết để giảm thiểu nguy cơ ra vào phòng xét nghiệm không hợp lý dẫn đến sai sót.

Nhiễm chéo từ chứng dương khi tra mẫu: sau khi tách chiết xong, tra mẫu vào đĩa PCR cần thao tác pipette chính xác và cẩn thận. Tốt nhất tra mẫu trước, sau đó đậy nắp lại rồi mới thao tác đến chứng dương để giảm thiểu nguy cơ này. Đặc điểm của kiểu nhiễm này thường rơi vào các giếng gần vị trí chứng dương nên kĩ thuật viên cần lưu ý chạy lại nếu nghi ngờ.

Nhiễm amplicon trong quá trình chạy PCR: amplicon là các bản sao DNA được tổng hợp trong quá trình PCR. Đối với PCR real - time các bản sao này được giữ nguyên trong ống phản ứng, tuy nhiên nếu không may ống bị hở nắp (do nhiệt độ cao) hoặc nút không chặt dẫn đến bay hơi thì amplicon sẽ thoát ra ngoài. Chỉ cần 1 lượng nhỏ amplicon thoát ra sẽ làm nhiễm máy real - time và môi trường phòng máy. Nếu máy realtime bị nhiễm ở block nhiệt thì mẻ chạy xét nghiệm tiếp theo sẽ bị ảnh hưởng nặng nề bởi kiểu nhiễm này thường có đồ thị lên rất sớm và đều nhau ở gần như tất cả các giếng nên không thể nhận định được kết quả. Chưa kể việc khắc phục hậu quả do nhiễm amplicon là tương đối gian nan và cần thời gian để lượng amplicon trong môi trường PXN giảm dần. Các giải pháp nhằm giảm thiểu nguy cơ nhiễm amplicon gồm: 1. Tập huấn cẩn thận nhân viên việc đóng chặt nắp ống PCR sau khi tra mẫu xong bởi chỉ cần một người bất cẩn thôi là cả phòng xét nghiệm vất vả 2. Hạn chế chạy máy liên tục, cần cho máy thời gian nghỉ ngơi, tốt nhất 1 đến 2 tiếng giữa các mẻ chạy 3. Vệ sinh phòng

máy bằng cồn và dung dịch DNAaway và đèn cực tím thường xuyên.

Dương tính giả do hóa chất để lâu: Thường là do probe giảm chất lượng dẫn đến tín hiệu khó phân biệt giữa nhiễu và đồ thị chuẩn. Trường hợp này thường gặp khi ống probe đã tan đông nhiều lần hoặc master mix đã dùng gần hết nên nồng độ probe/mồi bị ảnh hưởng. Khác với các trường hợp dương tính giả nêu trên, trường hợp này đồ thị thường xấu và không rõ curve, đôi khi tín hiệu huỳnh quang chỉ ngóc lên chút rồi chạy ngoằn ngoèo. Lúc này thì nên mix lại PCR dùng hóa chất mới và chạy lại để xem còn hiện tượng xảy ra nữa hay không. Nếu vẫn không quyết định được thì tốt nhất nên tách chiết lại hoặc lấy lại bệnh phẩm. Ngoài ra khi phải chạy nhiều mẫu thì các PNX thường hay pha mix sẵn và để vào tủ âm, nếu bảo quản các mix pha sẵn này không tốt cũng sẽ có thể gặp dương tính giả vì thường các mix pha sẵn sẽ không được đậy chặt nắp mà chỉ đậy hờ nên dễ bị nhiễm. Do đó nên ghi ngày pha mix lên ống, để mix ở nơi tránh ánh sáng trong tủ,

đồng thời pha xong nên dùng ngay trong vòng 3 - 5 ngày.

KẾT LUẬN

Xét nghiệm, truy vết và điều trị là ba trụ cột trong chiến lược phòng chống đại dịch Covid-19 ở nước ta.

Phương pháp xét nghiệm bằng kỹ thuật PCR được coi là tiêu chuẩn vàng để khẳng định ca bệnh Covid-19 nhờ độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

Trong xét nghiệm cần lưu ý các yếu tố kỹ thuật gây âm tính và dương tính giả ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.

Các nguyên nhân gây âm tính giả có thể do chất lượng mẫu không đạt, thời gian lấy mẫu, hay hóa chất sử dụng.

Các nguyên nhân gây dương tính giả thường liên quan đến thao tác của kỹ thuật viên cũng như hóa chất, trang thiết bị. Nhận định tốt các nguyên nhân này sẽ giúp phòng xét nghiệm làm tốt hơn trong phiên giải kết quả, đồng thời đảm bảo chất lượng xét nghiệm để phục vụ chống dịch hiệu quả hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med.* 2020;172(9):577-582. doi:10.7326/M20-0504

2. WHO. WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic. Available from: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/news/news/2020/3/who-announces-covid-19-outbreak-a-pandemic>

3. WHO. Weekly epidemiology update on COVID-19 – 25 May 2021. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---25-may-2021>

4. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT PCR (Berlin Jan 13th, 2020)

Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị viêm đường hô hấp

cấp do Sars-Cov-2- QĐ số 1344/QĐ-BYT ngày 25 tháng 3 năm 2020

5. Cevik, Muge et al. "SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis." *The Lancet. Microbe* vol. 2,1 (2021): e13-e22. doi:10.1016/S2666-5247(20)30172-5

6. Wu F et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv* 2020.03.30.20047365; doi:<https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>

7. Hướng dẫn tạm thời gộp mẫu xét nghiệm SARS-CoV-2. QĐ số 1817/QĐ-BYT ngày 7 tháng 4 năm 2021

8. Quy trình tách chiết RNA từ bệnh phẩm lâm sàng- QIAamp Viral RNA Mini Handbook, 2016

9. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT PCR (Berlin Jan 17th, 2020).

**SOME TESTING TECHNICAL CAUSATIONS MAY AFFECT THE RESULTS,
LEADING TO FALSE NEGATIVE AND FALSE POSITIVE FINDINGS OF PCR METHOD
IN DIAGNOSING SARS-COV-2**

Summary

Testing, tracing and treating are three main components of Vietnam preventative strategy against COVID-19 pandemic. The testing results, therefore, play a vital role in effectively delineating case - detected area. The PCR method could be considered as a gold standard to confirm the case thanks to its very high sensitivity and specificity. However, many technical aspects may affect the results, leading to false negative and false positive find-

ings. The false negative results may related to inappropriate sample quality, sample collection time or testing reagents. The false positive results might link to manually pipetting errors as well as reagent and instrument contamination. Better identifying such technique issues could improve the interpretation of PCR results and therefore, contribute to laboratory quality control for further pandemic - containing efforts.

Key words: Testing technique, False negative, false positive. SARS-CoV-2.